

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
BACHARELADO INTERDISCIPLINAR EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DO MAR

FÉLIX AUGUSTO SILVA DE ANDRADE – 120.863

PROSPECÇÃO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE EM
CAMARÕES MARINHOS CULTIVADOS EM SISTEMA INTENSIVO

ORIENTADOR: PROF. DR. IGOR DIAS MEDEIROS

SANTOS-SP

2019

Ficha catalográfica elaborada por sistema automatizado com
os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A553p Andrade, Félix Augusto Silva de .
PROSPECÇÃO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE EM
CAMARÕES MARINHOS CULTIVADOS EM SISTEMA INTENSIVO. /
Félix Augusto Silva de Andrade; Orientador Igor
Dias Medeiros. -- Santos, 2019.
31 p. ; 30cm

TCC (Graduação - Bacharelado Interdisciplinar em
Ciências e Tecnologia do Mar) -- Instituto do Mar,
Universidade Federal de São Paulo, 2019.

1. Aquicultura. 2. Biologia Molecular. 3.
Biomarcadores Moleculares. 4. Estresse. 5. Camarão.
I. Medeiros, Igor Dias, Orient. II. Título.

CDD 551.46

AGRADECIMENTOS

O autor agradece a todas as pessoas envolvidas para a realização deste estudo, principalmente a equipe do Laboratório de Aquicultura do Instituto do Mar da Universidade Federal de São Paulo, aos membros do laboratório de Biotecnologia Marinha Hytalo Rosa e Geovanni Beltran por toda ajuda durante o processamento das amostras, ao CNPq pelo fornecimento de bolsa para desenvolvimento de pesquisa durante 1 ano, e ao professor e orientador Dr. Igor Dias Medeiros por todo o empenho, auxílio e atenção empregado ao discente sem o quais este trabalho não seria realizado.

Conteúdo

1 RESUMO	4
2 INTRODUÇÃO	6
3 METODOLOGIA	11
3.1 Delineamento Experimental	11
3.2 Extração de RNA total	12
3.2.1 TRIzol Reagent	12
3.2.2 RNeasy Mini Kit	12
3.3 Tratamento com DNase	13
3.4 Síntese de cDNA	14
3.5 QPCR	14
3.6 Análise de Dados	15
4 RESULTADOS	16
4.1 Biometria dos animais	16
4.2 Extração de RNA total	16
4.3 QPCR	17
5 DISCUSSÃO	23
5.1 Extração de RNA total	23
5.2 Expressão gênica relativa	23
6 CONCLUSÃO	27
7 REFERÊNCIAS	28

1 RESUMO

O crescente aumento populacional somado ao grande consumo de produtos aquáticos tem gerado um incremento no esforço pesqueiro em todo mundo, entretanto as taxas de captura de diversos pescado têm permanecido estáveis nos últimos anos. Para contornar esse cenário a Aquicultura se apresenta como uma grande fonte de proteína animal de origem aquática. Um dos principais produtos de origem aquícola é o camarão, especificamente o *Litopenaeus vannamei*, a espécie de camarão mais produzida ao redor do mundo. Para garantir o bom desempenho de um sistema de cultivo, é necessária a manutenção de fatores abióticos e bióticos (qualidade da água, biossegurança dos tanques, tipos de substratos utilizados e etc). Dependendo da situação encontrada pelos camarões nos sistemas, estes podem apresentar quadros variados de estresse e não se desenvolver com todo o potencial que possuíam, reduzindo o rendimento do cultivo. Como uma forma de avaliar os níveis de estresse antes de se manifestarem em grandes níveis de organização, são utilizados diferentes biomarcadores, entre estes os moleculares, que possuem a resposta mais rápida da interação do organismo com o agente estressor. Com o intuito de avaliar a variação na expressão de genes com potencial para utilização como biomarcadores moleculares de estresse (Calreticulina - CRT e Catpsina B - CTSB), foi montado um experimento com camarões cultivados em 4 diferentes tipos de tratamentos (controle sem substrato, substrato lavado, substrato não lavado e substrato de Needlona). Cada tratamento constituía de 3 caixas plásticas com 32L de água marinha contendo 29 indivíduos da espécie *L. vannamei* e foram cultivados por 53 dias. Ao final do experimento os camarões foram sacrificados para coleta do hepatopâncreas de onde foi extraído o RNA total, seguido de síntese de cDNA para realização de QPCR visando verificar as taxas de expressão relativa de cada gene. Os resultados de expressão relativa mostraram que a Calreticulina foi mais expressa nos camarões dos tratamentos 1 e 3 (substrato lavado e de Needlona) enquanto que no tratamento 2 (substrato não lavado) este gene obteve o menor valor de expressão, evidenciando uma possível situação de menor estresse, dado que contrasta com a expressão da Catepsina B já que esta foi mais expressa durante o tratamento 2 apesar pouca variação dos níveis de expressão entre os tratamentos. Esses dados indicam um potencial uso da

Calreticulina como biomarcador molecular de estresse, porém mais estudos são necessários para estabelecimento da Catepsina B como biomarcador.

2 INTRODUÇÃO

Com o crescimento da população mundial que hoje já excede os 7,5 bilhões de pessoas (United Nations, Department of Economic and Social Affairs, e Population Division 2019), cresce também o dispêndio de recursos naturais variados, como os de origem aquática cuja principal utilização é a alimentação (FAO 2018). Considerando o consumo de animais aquáticos per capita, observa-se um aumento gradual desde 1961, onde eram consumidos 9 kg, até 2015, onde o consumo chegou aos 20,2 kg (FAO 2018). Observando a produção pesqueira marinha pode-se ver um grande aumento nas taxas de captura monitoradas desde 1980 (62,1 milhões de toneladas) até 2000 (85,0 milhões de toneladas) (“FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2017”), porém nota-se certa estabilização dessas taxas quando se observa anos posteriores, como por exemplo, o intervalo entre 2011 e 2016, onde o valor máximo da captura de pescados marinhos foi de 81,5 milhões de toneladas em 2011 e o valor mínimo foi de 79,3 milhões de toneladas em 2016 (FAO 2018). Para contornar a insuficiência do volume de produtos oriundos da pesca e evitar possíveis desdobramentos financeiros e quadros de fome, a Aquicultura (termo referente à atividade de cultivo de organismos aquáticos) vem se mostrando como uma grande fonte de proteína, complementando a necessidade global por produtos aquáticos.

Observando os dados de produção aquícola entre 1980 e 2017, constata-se o crescimento exponencial da atividade com uma produção (marinha e dulcícola) de 4,7 milhões de toneladas em 1980 e chegando a 80,1 milhões de toneladas em 2017 (“FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2017”). No Brasil a produção aquícola total ultrapassou a marca de 580 000 toneladas em 2016 (FAO 2018), chegando ao valor de 4,32 bilhões de reais (“Pesquisa da Pecuária Municipal - PPM | IBGE” [s.d.]). Dentre os principais organismos cultivados, destacam-se os crustáceos que representam aproximadamente 10% da produção mundial (7,862 milhões de toneladas) (FAO 2018) e dentre estes, os camarões que, no Brasil em 2003, representavam 79,5% (70.728,76 toneladas) do total da produção marinha e estuarina da aquicultura (“Estudo Setorial para Consolidação de uma Aquicultura Sustentável no Brasil” 2007). Entre os camarões cultivados, ressalta-se a espécie *Litopenaeus vannamei*, o camarão branco do pacífico, principal espécie de camarão

cultivada no Brasil (“Estudo Setorial para Consolidação de uma Aquicultura Sustentável no Brasil” 2007) e no mundo (FAO 2018).

Observando os tipos de sistemas de cultivo, é possível distingui-los analisando o tamanho das extensões de área utilizadas para os tanques, densidades de estocagem, a dependência de alimentação com ração e taxa de renovação de água. Os chamados sistemas extensivos são caracterizados pelas grandes extensões de território ocupadas pelos tanques, baixa densidade de estocagem (geralmente menor que 5 indivíduos/m²) e a não dependência de alimentação artificial (ração) ou renovação de água, por outro lado, os sistemas intensivos utilizam grande densidade de estocagem por unidade de área (200 a 2000 indivíduos/m²), menor volume de água em cada tanque, e grande dependência de alimentação por meio de ração e outros tipos de material nutricional, necessidade de sistemas de aeração para manutenção dos níveis de oxigênio na água e ainda uma certa taxa de renovação de água (dependendo do sistemas) que pode variar de 5 a 40% de troca de água/dia (“Estudo Setorial para Consolidação de uma Aquicultura Sustentável no Brasil” 2007; Tacon 2002; Tacon, Nates, e McNeil 2004).

A migração de sistemas extensivos para intensivos de produção, no cenário da carcinicultura (cultivo de camarões) brasileira, foi impulsionada pela maior produtividade e maior controle das variáveis presentes no tanque como disponibilidade de matéria orgânica para alimentação e quantidade de oxigênio dissolvido, porém o evento que levou os produtores brasileiros a utilizar sistemas intensivos adaptados para que a renovação de água nos tanques não fosse necessária, foi um grande surto de doenças relacionadas ao Vírus da Síndrome da Macha Branca (WSSV) e da mionecrose (IMNV) que atingiu o país início do século 21 (Fóes 2012). Como uma forma de evitar a geração de efluentes carreadores de espécimes virais e a possível contaminação de cultivos inteiros pela incorporação de água contaminada nos sistemas, foi desenvolvido o sistema de bioflocos, um agregado microbiano capaz de manter as características da água a níveis seguros para os organismos cultivados através de processos metabólicos, gerando uma ciclagem de nutrientes, reduzindo a necessidade da renovação de água e ainda constituindo uma fonte de alimentação alternativa visto que tal agregado poderia ser consumido pelos camarões (Fóes 2012; Hargreaves 2013). Assim, este sistema de bioflocos passou a ser empregado em localidades onde a disponibilidade de área e

água eram fatores limitantes para o cultivo, possibilitando a implantação de fazendas sem que fosse necessária uma grande reposição de água contínua (Hargreaves 2013). Além disso, para aumentar ainda mais a eficiência dos sistemas que se utilizam desses agregados microbiológicos, a adição de estruturas artificiais no interior dos tanques de cultivo para aumentar a área superficial interna tem se mostrado de grande relevância, servindo tanto para fixação dos camarões quanto dos microrganismos envolvidos na ciclagem de nutrientes (Schveitzer et al. 2018; Moss e Moss 2004) e reduzindo possíveis interações comportamentais negativas (Abdussamad e Thampy 1994). Essas estruturas, chamada de substratos, são confeccionadas com diversos tipos de matérias e podem ser alocadas nos tanques de diferentes formas.

Quando um organismo entra em determinado sistema de cultivo, uma das preocupações é quanto ao estresse encontrado no sistema, uma vez que isso pode acabar influenciando no desempenho produtivo do indivíduo como mostraram alguns trabalhos (Delgado-Gaytán et al. 2015; de la Vega et al. 2007; Visudtiphole et al. 2017). As respostas dos organismos podem variar de acordo com o tipo de estresse ao qual o animal é submetido, fato observado em estudos conduzidos sob diferentes condições de estresse como variação térmica (de la Vega et al. 2006), hipóxia (de la Vega et al. 2007), mudanças de salinidade (Zhao et al. 2015), mudanças de pH (Han, Wang, Wang, et al. 2018), a ausência de determinado substrato (Abdussamad e Thampy 1994) assim como o tipo de substrato e o tipo de sistema em que este é inserido (Schveitzer et al. 2018). Este último pode configurar um quadro de estresse visto que os indivíduos da família Penaeidae tornam-se bentônicos em seu estágio pós-larval (Zhang et al. 2019) evidenciando a relação da associação que tais organismos possuem com o substrato ou pelo fato do substrato aumentar a área de superfície interna do tanque servindo de base de fixação para aglomerados de microrganismos que participam dos processos de ciclagem de nutrientes e dos camarões que, com o aumento de sua biomassa, passam a competir por espaço dentro do tanque.

As manifestações em resposta a essas situações são verificadas nos organismos desde variações nos níveis de expressão gênica (de la Vega et al. 2006; Zhao et al. 2015) até o nível histopatológico com danos aos tecidos (Han, Wang, Wang, et al. 2018). Tais alterações nos padrões celulares, bioquímicos e

moleculares, quando mensuráveis, são classificadas como biomarcadores (Hulka e Wilcosky 1988) e estão, normalmente, relacionados com o estado de saúde dos organismos. Ao comparar os tipos de biomarcadores passíveis de serem utilizados em diversos estudos, ressaltam-se aqueles que são analisados a nível molecular na expressão de determinados genes, por sua rapidez na resposta, sendo os primeiros sinais de interação entre um agente estressor e o organismo afetado, e possuir um caráter preditivo (Sarkar et al. 2006)

Com essa perspectiva de análises moleculares, alguns estudos já foram realizados observando diferentes padrões na expressão de genes diversos. Dentre estes genes podemos destacar: *Calreticulina (CRT)* e *Catepsina B (CTSB)*, onde cada um tem um importante papel na regulação dos processos que ocorrem no camarão.

O *CRT* é o gene responsável pela expressão da proteína CRT que possui diversas atuações no retículo endoplasmático das células, porém com duas funções bem demarcadas, atuação como chaperona e regulação de cálcio (Michalak et al. 1999). Os padrões de sinalização de cálcio marcados pela expressão deste gene são relatados em estudo realizado com o *P. monodon* submetido a diferentes formas de estresse abiótico e uma forma de estresse biótico (aumento de temperatura, variação de salinidade, estado de hipóxia e infecção por um patógeno) (Visudtiphole et al. 2017), além disso, a avaliação da expressão durante o estágio de muda (pré, durante e pós muda) entre outras situações (estresse termal e estresse induzido por patógeno) foi realizada com outro penaeídeo, o *Fenneropenaeus chinensis* (Luana et al. 2007).

O gene *CTSB* é o responsável pela expressão de uma cisteína protease que atua primariamente como uma enzima lisossomal na digestão (Stephens et al. 2012), porém há relatos de que esta proteína possui envolvimento na apoptose das células (Chwieralski, Welte, e Bühling 2006). A expressão de genes relacionados a apoptose, incluindo o *CTSB* foi analisada nos hemócitos da hemolinfa do camarão *L. vannamei* sob diferentes concentrações de nitrito e quanto a períodos sem alimentação (Guo et al. 2013). Este gene foi também analisado quanto à especificidade de expressão entre diferentes tecidos de camarão (Stephens et al. 2012) e quanto à variação da expressão induzida pelo Síndrome do Vírus da

Mancha Branca (WSSV) (Li et al. 2013). Assim, o objetivo deste estudo foi analisar a expressão dos genes *CRT* e *CTSB* no camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistema intensivo, sem renovação de água, com a utilização de diferentes tipos de substrato para fixação para possível identificação de biomarcadores moleculares de estresse relacionados com a densidade de estocagem no tanque.

3 METODOLOGIA

3.1 Delineamento Experimental

O experimento foi montado e mantido no Laboratório de Aquicultura do Instituto do Mar da Universidade Federal de São Paulo – Campus Baixada Santista. Para sua realização foram montados 4 tratamentos com 3 réplicas totalizando 12 unidades experimentais. Tais unidades experimentais consistiram de caixas plásticas de 32L contendo 29 camarões com peso médio próximo de 6 gramas expostos as mesmas condições de temperatura (28°C) e salinidade (20). Os parâmetros de qualidade da água foram avaliados diariamente (oxigênio dissolvido e temperatura), duas vezes por semana (salinidade, alcalinidade, análises de amônia e nitrito) e três vezes por semana (pH). Os camarões utilizados (Pós-larvas PLs10 specific pathogen free – SpeedLine SPF) foram adquiridos de um laboratório independente (Aquatec LTDA, Canguaretama, RN, Brasil) e cultivados até a realização do experimento. Os tratamentos foram substrato lavado (tratamento 1), substrato não lavado (tratamento 2), substrato de Needlona (tratamento 3) e sem substrato (controle). Os substratos utilizados nos tratamentos 1 e 2 foram confeccionados a partir de telas de mosquiteiro enquanto o substrato do tratamento 3 foi confeccionado com Needlona. O objetivo da diferenciação dos tratamentos foi variar os tipos de substratos para verificação taxas de expressão dos genes selecionados que poderiam constatar possíveis situações de estresse relacionados a densidade de estocagem das caixas. No tratamento 1 o substrato era retirado a cada 2 dias para que fosse limpo e, afim de evitar variações na manipulação dos tanques, em todos os tratamentos, exceto o 1, foi simulado o procedimento de retirada do substrato. Antes da exposição dos camarões aos tratamentos, foram selecionados 4 indivíduos aleatórios para dissecação e extração do hepatopâncreas, para que assim, pudessem ser feitas análises de expressão dos animais antes do contato com o agente estressor (Tempo 0). Esse experimento durou 53 dias e ao final deste período 4 animais de cada tratamento foram selecionados para dissecação e coleta do hepatopâncreas, que foi imediatamente conservado em 250µL de TRIzol.

3.2 Extração de RNA total

No total foi realizada a extração de 20 amostras sendo 4 do tempo 0, e 4 de cada um dos 4 tratamentos. O RNA total foi extraído das amostras de tecido com a utilização de 2 processos de extração, um utilizando o TRIzol Reagent (Sigma-Aldrich) e outro utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen), ambos seguindo as instruções do protocolo do fabricante com algumas alterações em certos pontos. A seguir estão explicados cada procedimento em cada um dos protocolos:

3.2.1 TRIzol Reagent

Para extração de RNA total foram utilizados aproximadamente 100mg de tecido, hepatopâncreas de camarão, os quais foram alocados em um microtubo de 1,5mL com 500µL de Trizol e homogeneizadas com homogeneizador de Teflon. As homogeneizações foram seguidas por uma incubação de 30 minutos das amostras a temperatura ambiente para que, em seguida, fossem adicionados 150µL de Clorofórmio e agitadas vigorosamente por 15 segundos. Após a agitação as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Finalizado o tempo de incubação as amostras foram centrifugadas a 12000g por 15 minutos a 4°C. A passagem pela centrífuga após a adição do Clorofórmio possibilitou a separação de fases nas amostras sendo que o RNA se encontrava na fase aquosa sobrenadante. Tal sobrenadante aquoso foi transferido para outro microtubo de 1,5mL limpo e a esse sobrenadante foram adicionados mais 350µL de Isopropanol gelado seguido por mais uma incubação a temperatura ambiente por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas mais uma vez a 12000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então descartado e ao pellet restante foram adicionados 500µL de etanol 75%, para lavagem, seguidos de uma passagem pelo Vortex e centrifugação a 7500g por 5 minutos a 4°C. Este processo foi realizado duas vezes. Ao final, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi deixado para que secasse a temperatura ambiente por 10 minutos para então ser ressuscitado em 50µL de água livre de RNase. Para total dissolução do pellet na água a amostra foi deixada em um bloco de aquecimento por 5 minutos a 55°C.

3.2.2 RNeasy Mini Kit

Para a utilização deste kit de extração foram usados aproximadamente 30mg de tecido, hepatopâncreas de camarão, e preparadas uma solução de Buffer (tampão) RLT + β -Me (Beta mercaptoetanol) com uma proporção de 1 μ L de β -Me para cada 100 μ L de Buffer RLT e uma solução com 4 volumes de etanol (96-100%) ao Buffer RPE.

As amostras de tecido receberam 600 μ L da solução Buffer RLT + β -Me e foram e homogeneizadas em microtubos de 2mL. Já homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas a 12000g por 3 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante transferido para um novo microtubo. Ao novo microtubo foram adicionados 600 μ L de etanol 70% e a mistura foi feita com a pipeta. 600 μ L dessa mistura foram transferidos para uma RNeasy Mini spin column (coluna de rotação para retenção de material) que foi colocada em um novo microtubo de 2ml para coleta do material descartado. O conjunto foi centrifugado a 8000g por 45 segundos a 4°C e o material que passou pela coluna e se alojou no microtubo foi descartado. O restante da mistura foi transferido para a coluna e centrifugado a 8000g por 45 segundos a 4°C para aproveitamento de todo o material. Com a amostra retida na coluna, foram adicionados 700 μ L do Buffer RW1 e a mistura foi centrifugada a 8000g por 45 segundos a 4°C seguido da adição de 500 μ L do Buffer RPE e nova centrifugação a 8000g por 45 segundos a 4°C. A adição de 500 μ L do Buffer RPE foi feita uma segunda vez seguida de nova centrifugação 8000g por 2 minutos e 30 segundos a 4°C. Em cada centrifugação, todo material que passava pela coluna e ficava retido no tubo era descartado. A amostra de RNA presente na coluna foi ressuspensa colocando a coluna em um microtubo de 1,5mL, adicionando 50 μ L de água livre de RNase para eluição e centrifugando-a a 8000g por 1 minuto a 4°C.

3.3 Tratamento com DNase

Para evitar possível contaminação com DNA genômico, as amostras foram tratadas com DNase I (Sigma-Aldrich).

Para tal foram utilizados 1000ng de RNA + água livre de RNase para completar um volume de 8 μ L. Em um tubo de 200 μ L foram adicionados 8 μ L de RNA diluído em água livre de RNase, 1 μ L de Buffer (tampão) de reação e 1 μ L de DNase I. Todos foram misturados com a pipeta e deixados incubando por 15 minutos a

temperatura ambiente para degradação do DNA. Após essa etapa, foi adicionada a Solução de Parada (EDTA) para interromper a reação e inativar a DNase, seguido de aquecimento a 70°C por 10 minutos para desnaturar o RNA, resfriamento no gelo e armazenamento no freezer (-20°C).

3.4 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada com a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Sigma-Aldrich) a partir de 1µg de RNA total. Em um tubo limpo de 0,2mL foram adicionados: 1µL de DNTP (Sigma-Aldrich) (10mM), 0,86µL de oligo dT (Sigma-Aldrich) (3 µM), 1,2µL de Primers randômicos (Sigma-Aldrich) (3µM), 1µL do RNA (1µg), a solução foi completada com água livre de RNase para atingir um volume de 10µL. Toda a solução foi misturada com a pipeta e centrifugada a 8000g por 4 minutos a 4°C. Após centrifugação a mistura foi incubada a 70°C por 10 minutos e resfriada no gelo. Com a amostra resfriada foram adicionados à mistura: 2µL de 10X M-MLV Reverse Transcriptase Buffer, 1µL da enzima M-MLV Reverse Transcriptase, 0,5µl RNase Inhibitor (40 units/µl) e 6.5µl de água livre de nucleases (DNases e RNases). Toda a mistura foi incubada a 37°C por 50 minutos e, em seguida aquecida a 85°C por 10 minutos para desnaturação da enzima transcriptase reversa.

3.5 QPCR

Para reação de PCR foi utilizado uma mistura de reação contendo 10µL de EvaGreen (mix de fluoróforo, dNTP, tampão para reação e enzima polimerase), 4µL de água livre de nuclease, 2µL de Primer forward (3µM), 2µL de Primer reverse (3µM) e 2µL de cDNA (diluído 1:10) totalizando um volume de reação de 20µL. Os primers utilizados na reação são mostrados na tabela 1 e o setup da reação é apresentado na tabela 2. Para que os resultados entre as expressões de genes diferentes pudessem ser comparados, foi necessária a normalização dos resultados utilizando um gene normalizador, um gene que mantivesse seus níveis de expressão estáveis entre cada tratamento. Visando encontrar tal gene foram observadas as expressões dos genes *Tubulina* e *G3PDh*, para seleção daquele que apresentasse menor variação. O gene da Tubulina realiza a produção do material básico para

formação dos microtúbulos, estruturas do citoesqueleto que atuam em diversos processos celulares (Han; Tang; Kim, 2018) como por exemplo na anáfase durante a divisão celular. O *G3PDh* codifica uma das enzimas atuantes durante o metabolismo da glicose para geração de energia (Lima et al., 2009). As sequências de ambos se encontram na tabela 1.

Tabela 1: primers dos genes, CRT, CTSB, TUB, G3PDh. (5' – 3').

Gene	Primer F	Primer R
<i>CRT</i>	GTGAAGGTGGGGACTTGCTC	AACCCCAAACAGGGCAAGAA
<i>CTSB</i>	CATGGGTGTCCATCCCGATT	CCATGCAGCTCTGGAGTCAA
<i>G3PDh</i>	AATGACCCCTTCATCACGCT	GACGGTGATCTTGTGTCCGT
<i>TUB</i>	GTTGGCAGACAACACTGCACTG	TGCTCTTCTTGCCGTAGTCG

Tabela 2: Programa do termociclador nas reações de qPCR.

Temperatura	Tempo	
Setup – 94°C para total desnaturação do cDNA	2 minutos	Ciclo repetido 39 vezes
94°C	15 segundos	
52°C	15 segundos	
60°C	30 segundos	
Hold – 60°C	4 minutos	
Melting – 52°C até atingir 94 °C	30 segundos	Incremento de 0,5°C por ciclo (+0,5°C/ciclo)

3.6 Análise de Dados

A análise dos dados da reação foi realizada segundo o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen 2001).

4 RESULTADOS

4.1 Parâmetros de qualidade da água

Durante o período de exposição, os parâmetros de qualidade da água mantiveram-se em certa constância, não variando significativamente. As leituras de temperatura obtiveram valores entre 27,8 e 28,3 °C; o oxigênio dissolvido permaneceram entre 5,9 e 6,1 mg/L; a salinidade se manteve constante em 20 g/L em todos os tratamentos; os valores de pH estavam entre 7,6 e 7,8; a alcalinidade variou entre 149,7 e 178,0 mgCaCO₃/L; a amônia total manteve-se em 0,2 mg TAN/L; os sólidos suspensos totais variaram entre 1.003,3 e 933,0 mg/L e os sólidos sedimentáveis ficaram entre 11,8 e 13 ml/L.

4.1 Biometria dos animais

No início do experimento, os camarões alocados nas unidades experimentais possuíam uma média de peso variando entre 5,5 e 5,6 g. Passados os 53 dias de exposição dos animais aos tratamentos, estes foram retirados das unidades experimentais e sacrificados com uma média de peso entre 9,6 e 10 g. O ganho de peso médio semanal e o ganho de biomassa foram maiores nas unidades experimentais que permaneceram imersas sem lavagem.

Todos os dados de qualidade da água e de biometria dos organismos registrados neste trabalho foram originalmente analisados e medidos no trabalho de Rafael Pulcinelli Santilli e Pedro Gonçalves de Castro (2018) trabalho não publicado.

4.2 Extração de RNA total

As extrações de RNA foram realizadas com indivíduos dos 3 tratamentos, controle e do tempo 0. As concentrações e purezas de todas as amostras são dispostas na tabela 3. Essas leituras foram realizadas em espectrofotômetro Nanodrop Lite (Thermo Scientific) utilizando 1µL de RNA.

Tabela 3: Quantificação das amostras de RNA total

Tratamento	Amostra/Indivíduo	Razão 260/280	Concentração ng/ μ L
Controle (Sem Substrato)	1M3	1,90	323,4
	5M3	1,89	307,8
	7M2	2,02	350,3
	7M3	1,93	250,6
Tratamento 1 (Substrato lavado)	4M3	1,89	241,9
	9M2	2,01	154,5
	9M3	1,87	311,1
	12M3	1,92	284,6
Tratamento 2 (Substrato não lavado)	3M2	2,06	946,2
	6M2	2,06	796,9
	6M3	1,90	396,6
	10M3	1,90	167,8
Tratamento 3 (Substrato de Needlona)	2M2	2,03	377,6
	2M3	1,88	289,7
	8M3	1,90	302
	11M3	1,96	347,1
Tempo 0	A	1,92	469,9
	D	1,88	530,5
	F	1,60	598,8
	G	1,89	582,2

4.3 QPCR

Para verificação da especificidade dos primers utilizados, foram geradas curvas de melting ao final da reação. Os picos resultantes foram únicos e bem definidos como mostrados nas figuras de 1 a 4 sugerindo que seu anelamento ao cDNA foi específico.

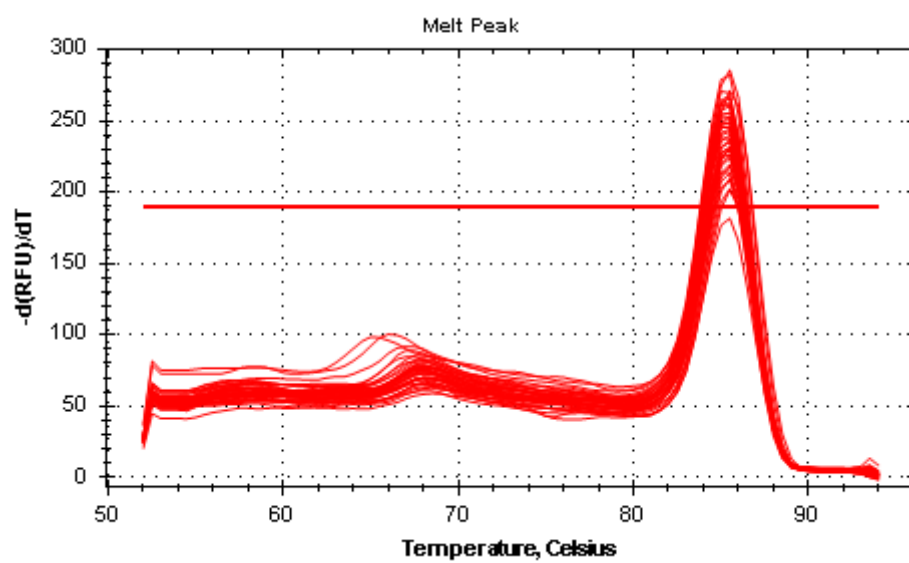


Figura 1: Curva de melting para o gene *G3PDH*.

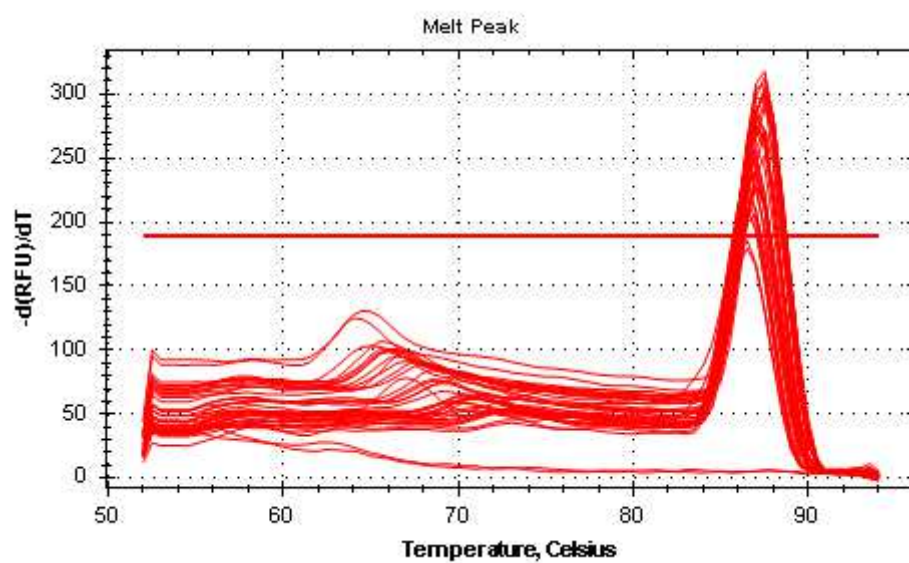


Figura 2: Curva de melting para o gene *Tubulina*.

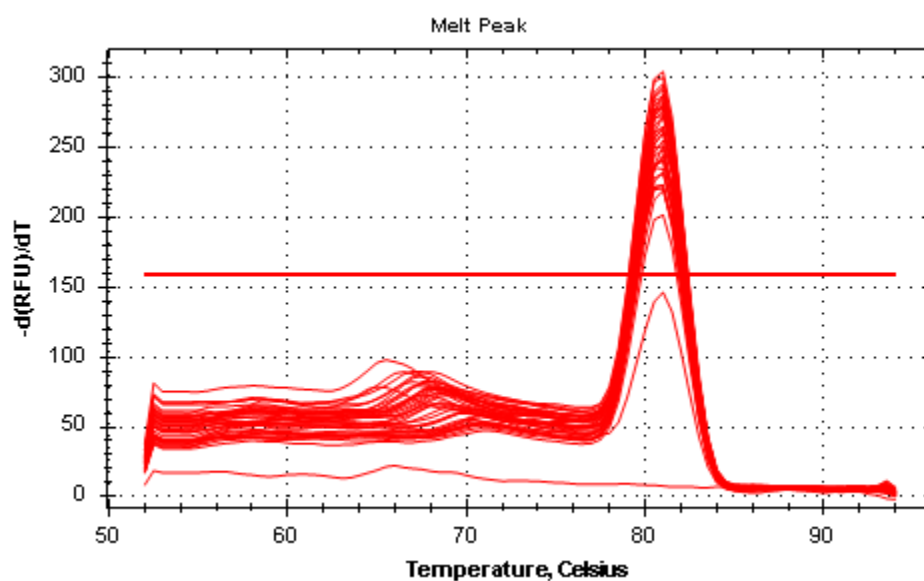


Figura 3: Curva de melting para o gene *Calreticulina*.

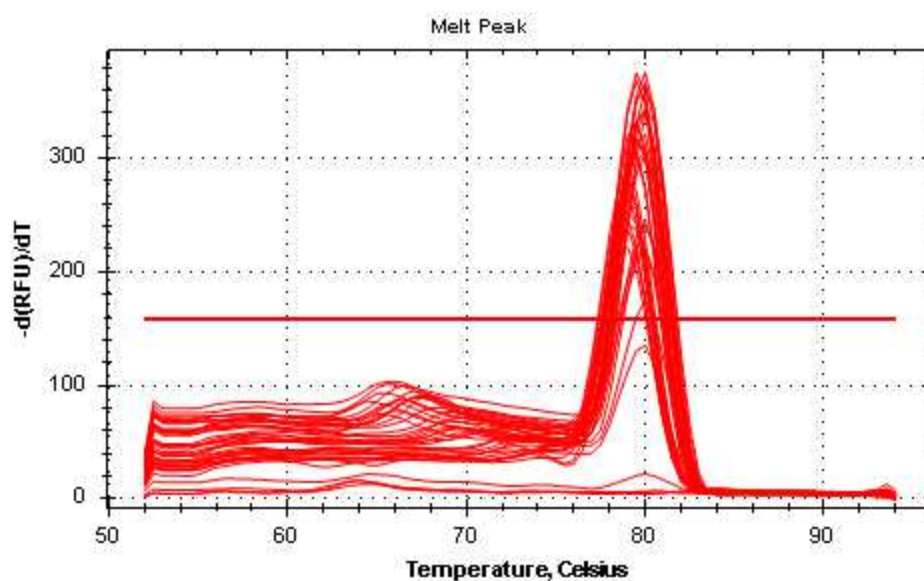


Figura 4: Curva de melting para o gene *Catepsina B*.

O gene normalizador escolhido para a análise dos resultados do PCR foi o *G3PDH* visto que este gene apresentou menor variação quando se comparou os Cq's gerados com o outro normalizador (*Tubulina*).

G3PDH

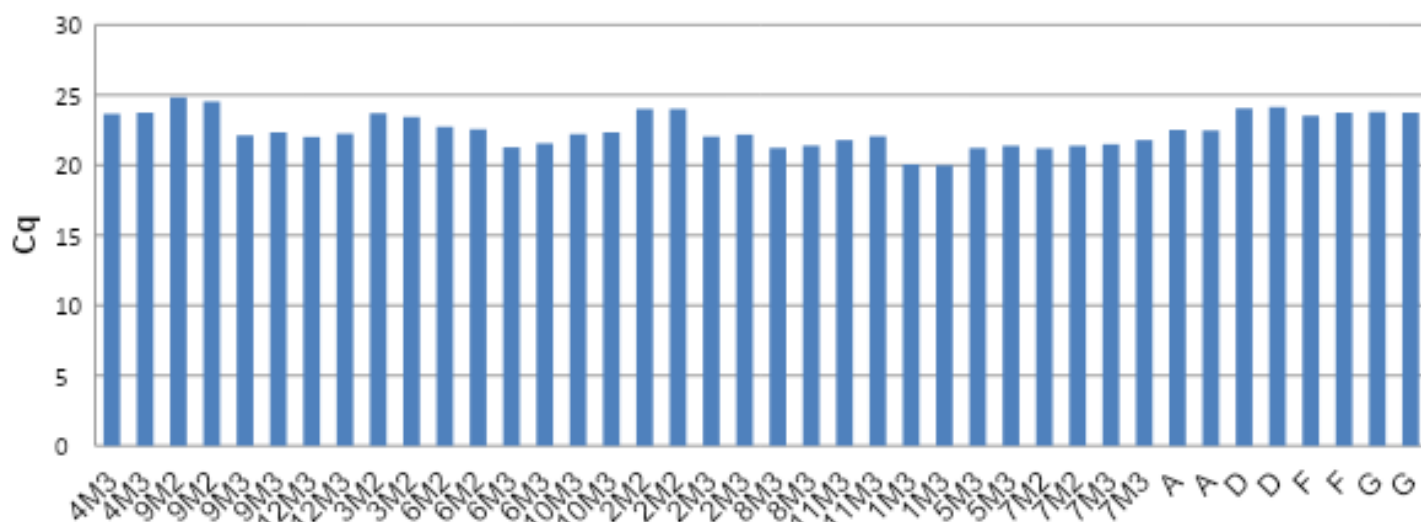


Figura 5: Gráfico dos valores de Cq do gene *G3PDH*.

Tubulina

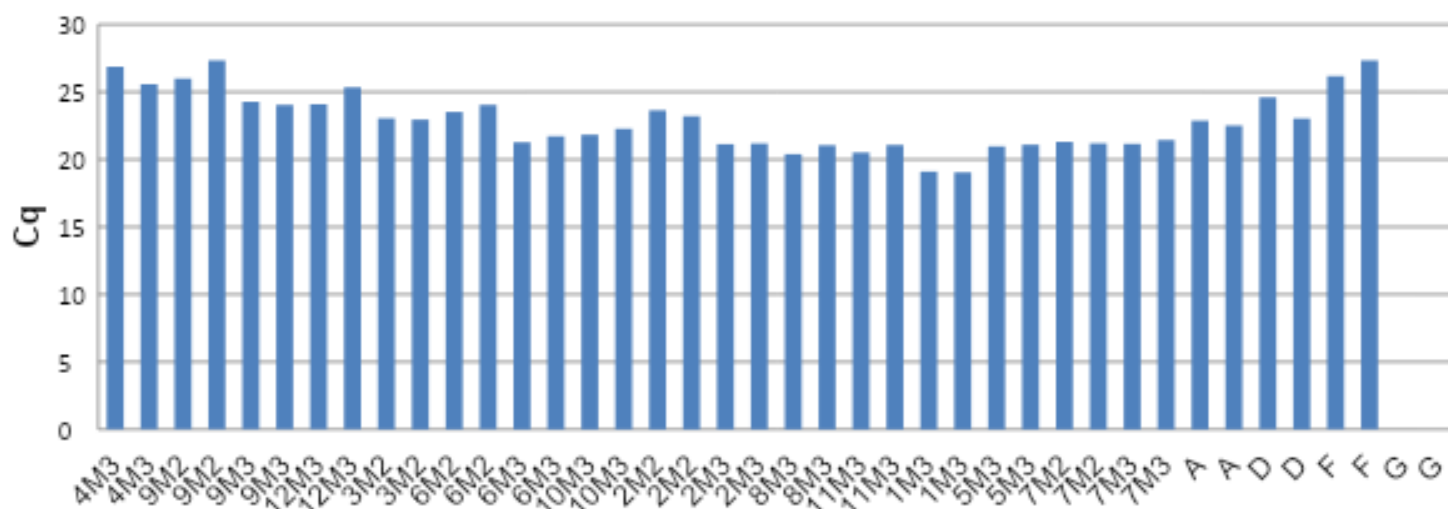


Figura 6: Gráfico dos valores de Cq do gene *Tubulina*.

Para verificação das expressões relativas dos dois genes alvos, foram gerados gráficos a partir dos cálculos feitos com os genes normalizados segundo o método $2^{-\Delta\Delta ct}$. A expressão relativa do *Calreticulina* se mostrou maior no tratamento com substrato lavado e teve seu menor valor com os organismos do tempo 0. Já o *Catepsina* atingiu seu valor máximo de expressão relativa no tempo 0 e seu valor

mínimo no tratamento 3 (substrato de Needlona). As expressões relativas estão dispostas nas duas imagens seguintes (Figs. 7 e 8).

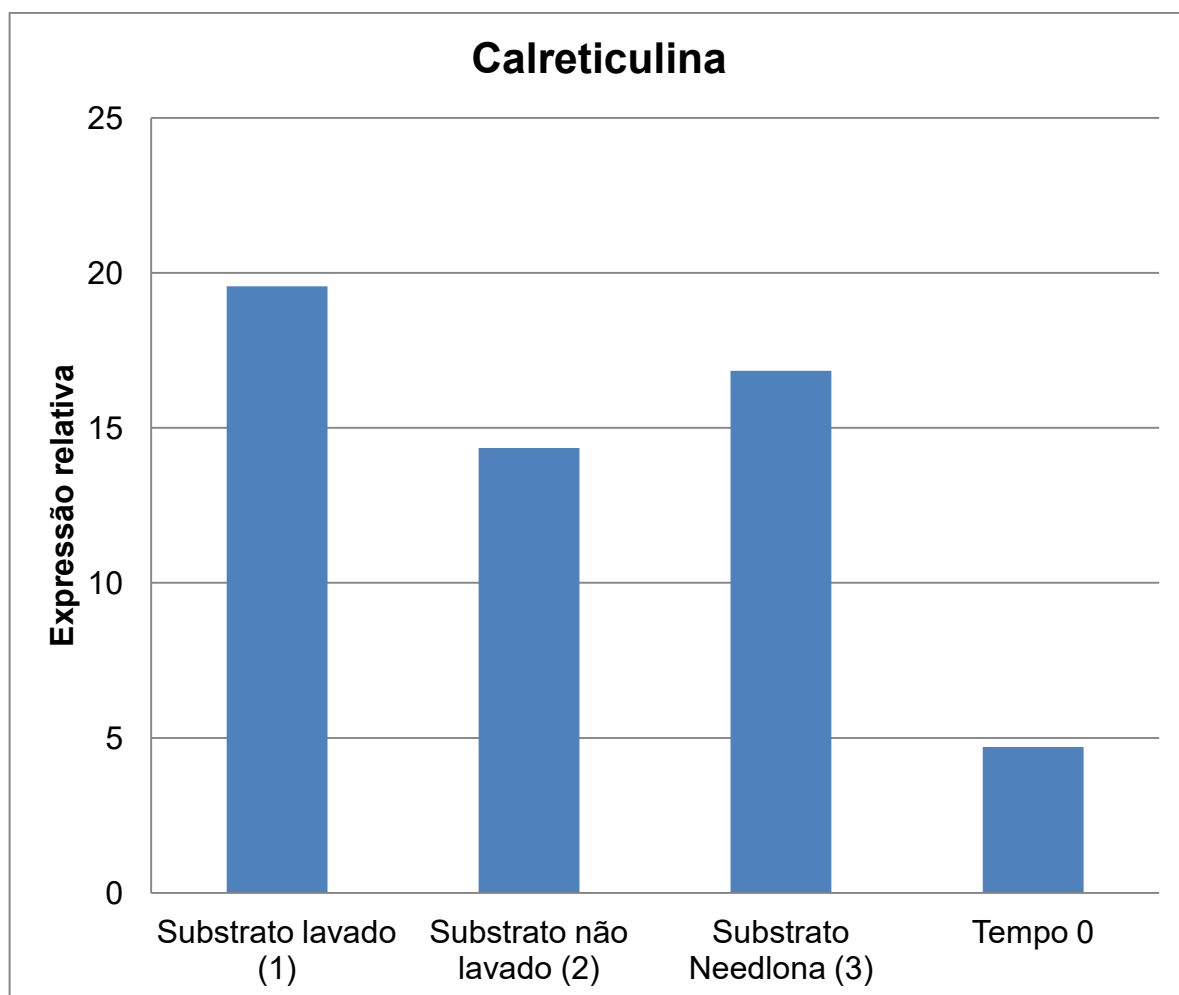


Figura 7: Expressão relativa do gene *Calreticulina* normalizada pelo gene *G3PDh*.

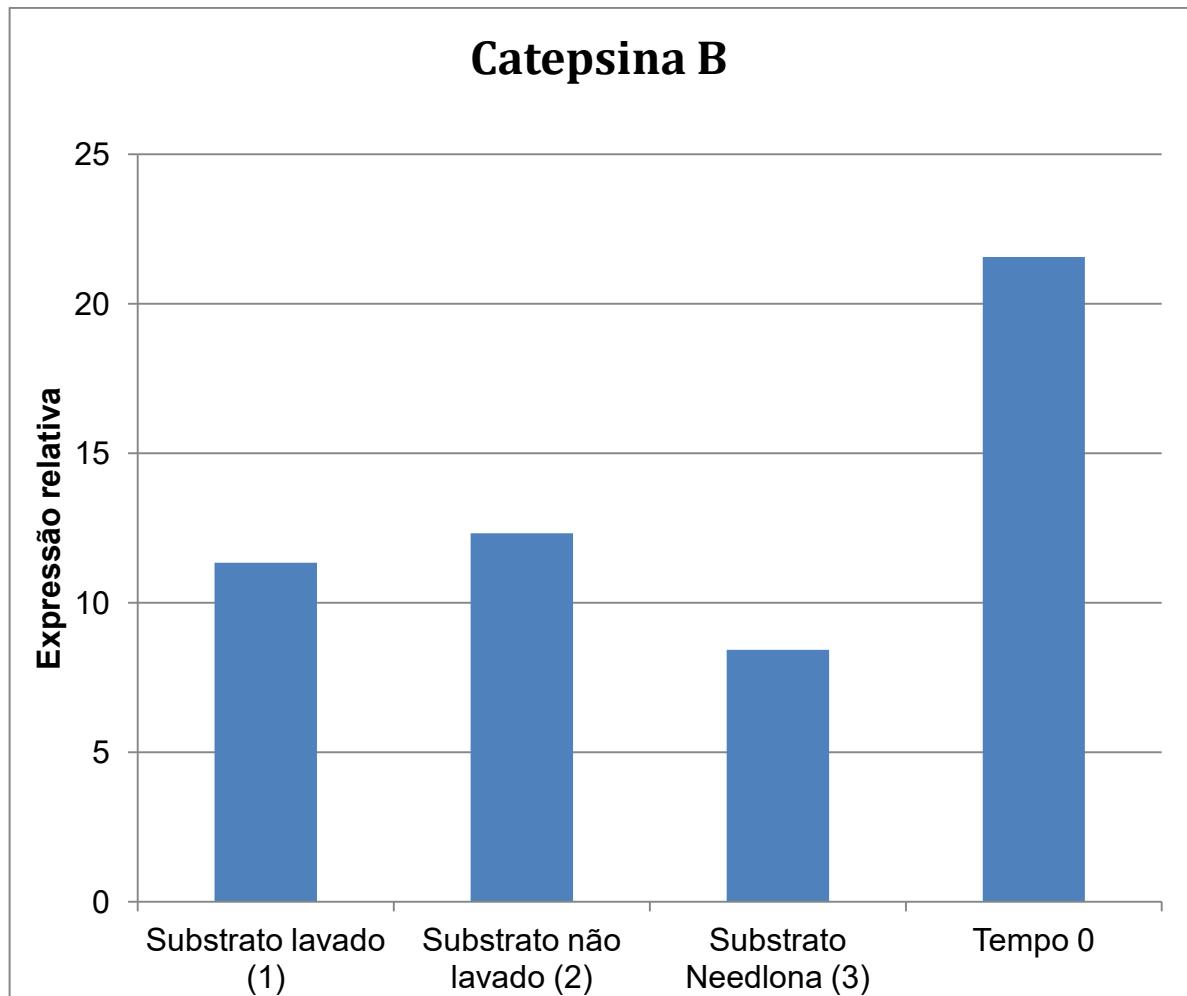


Figura 8: Expressão relativa do gene *Catepsina B* normalizada pelo gene *G3PDh*.

5 DISCUSSÃO

5.1 Extração de RNA total

Foi necessário o uso de dois protocolos de extração de RNA distintos uma vez que as primeiras extrações realizadas com o TRIzol resultaram em RNA total de baixa qualidade (baixa razão A260/280) gerando dúvidas quanto a integridade da amostra e esterilidade de todos os componentes utilizados no procedimento. Com a utilização do kit da Qiagen, resultados melhores foram alcançados e, após outras tentativas de extração com o TRIzol, foi verificado que o problema havia sido a pouca quantidade do reagente utilizada no processo. As amostras de RNA que possuíam concentrações muito altas (superiores as 1000ng/μL) foram diluídas em água livre de nucleases, chegando aos valores apresentados na tabela 3. Para evitar possíveis variações nas quantidades de cDNA utilizadas na reação, foram feitos cálculos tomando por base 1000ng de RNA total para a realização da síntese.

5.2 Expressão gênica relativa

Os processos ocorridos em organismos durante períodos de estresse podem gerar e geram alterações em diversos níveis de organização. Tratando-se da expressão de genes, esses processos podem levar a um favorecimento da expressão de determinados genes e silenciamento de outros. A busca por biomarcadores moleculares permite observar esses padrões de expressão e inferir sobre o estado de saúde que o organismo se encontra. Com essa perspectiva e observando a expressão relativa do gene *Calreticulina*, pode-se sugerir que o organismo enfrentou situações de estresse por adensamento mais severas durante os tratamentos com substrato lavado (1) e com Needlona (3), enquanto no tratamento com substrato não lavado (2) o substrato não foi limpo, se mostrando um ambiente mais estável e menos desafiador para os camarões, já no tempo 0 os camarões não haviam passado por nenhum tipo de tratamento, exibindo expressão bem mais baixa do que as apresentadas nos tanques de exposição.

Tendo em mente que a Calreticulina é uma das proteínas relacionadas com os processos de sinalização de cálcio nas células e que muitos mecanismos de estresse acabam utilizando a sinalização de cálcio para ativação de possíveis respostas (Visudtiphole et al. 2017), é possível compreender tais alterações evidenciadas na figura 8. Considerando que no tratamento 1 o substrato era lavado

a cada dois dias todo o perifiton formado sobre o substrato era removido, reduzindo a possível fonte de alimento alternativo dos camarões.

Alterações na expressão relativa de *Calreticulina* já foram reportadas nos trabalhos de Luana et al. (2015) com o camarão *Fenneropenaeus chinensis* que foi submetido a um tratamento de estresse termal e por infecção pelo Vírus da Mancha Branca, e de Visudtiphole et al. (2017) onde o *P. monodon* foi exposto a um tratamento térmico, assim como outros estresses abióticos, e recebeu doses de injeções contendo um aglomerado bacteriano (*Vibrio harveyi*). Tanto Luana et al. (2015) quanto Visudtiphole et al. (2017) utilizaram um desenho experimental para o choque térmico muito semelhante, com a diferença do tecido analisado e da espécie de camarão utilizada como material biológico (*Fenneropenaeus chinensis* e *Penaeus monodon* respectivamente) e ambos obtiveram um aumento (variação positiva) na expressão de *Calreticulina* em um período de 3 a 4 horas de tratamento térmico (35°C). Outro fator abiótico que contribuiu para esse aumento foi a variação de salinidade realizada por Visudtiphole et al. Tanto o aumento quanto sua diminuição geraram outro incremento da expressão entre o intervalo de 3 e 6 horas de exposição. (Gao et al. 2016) também reportaram aumento da expressão de *Calreticulina* após 6 horas de exposição dos organismos a ambiente com baixa salinidade (2psu) e retorno das taxas de expressão a níveis normais após 24 e 96 horas, sugerindo que o aumento da expressão foi uma resposta de um mecanismo de proteção contra o choque osmótico, enquanto o retorno das taxas a seus níveis anteriores seria a degradação do sistema imune que não pôde sustentar tal resposta ao quadro de estresse por um intervalo de tempo mais longo. Todos esses dados relacionados com estresse abiótico fornecem informações pertinentes sobre o comportamento do mecanismo de transcrição deste gene e, assim como cada uma das situações que induziram a intensificação de sua transcrição, a natureza de determinado substrato ou a repetida manipulação de um componente de fixação do tanque pode intensificar a transcrição de *Calreticulina* como uma forma de combater os efeitos negativos gerados por essa interação. Além da relação do cálcio com o sistema imune, este elemento é de extrema importância para o processo de muda dos camarões e sendo a *Calreticulina* uma molécula reguladora dos níveis de cálcio no organismo, pode-se inferir que uma variação da transcrição deste gene pode levar a interrupção da homeostase a nível celular e em outros níveis, podendo

ocasionar alterações com efeitos negativos relacionadas com o processo de muda do camarão.

A Catepsina B, uma protease que atua na hidrólise de outras proteínas, apresentou um aumento muito maior no tempo 0 e uma expressão mais estável em todos os 3 tratamentos. Análises de expressão de *Catepsina* foram realizada por Stephens et al. (2012) simulando situações de falta de alimento e a variação encontrada nos níveis de expressão de *Catepsina* foram constatadas apenas após 72 horas de privação de alimento experimentada pelo *L. vannamei*. Considerando esse intervalo de tempo podemos descartar a hipótese de que a expressão nos tratamentos foi afetada pela falta de alimentação visto que, mesmo no tratamento onde o substrato foi lavado várias vezes, sendo removido o agregado de organismos que poderia constituir mais uma fonte de alimento, estes recebiam as quantidades de ração necessárias para seu desenvolvimento diariamente, além disso, o tratamento com substrato não lavado (2) foi mantido intacto quanto a composição de epibiontes e mesmo assim este tratamento apresentou os valores de expressão relativa mais altos dentre os grupos tratados. O mesmo se aplica aos organismos do tempo 0 visto que estes estavam sob cultivo intensivo recebendo as quantidades adequadas de ração diariamente. Shekhar, Kiruthika, e Ponniah (2013) sugerem que a constatação da alteração da expressão deste gene em situações de escassez de comida e após a ingestão são fortes argumentos que confirmam a funcionalidade da molécula quanto à hidrólise de proteínas e, observando os resultados por esta perspectiva, nota-se que as taxas de expressão relativa nos 3 tratamentos não apresentou grandes variações, isso porque durante o cultivo, os tanques recebiam quantidades de ração muito parecidas devido a mesma densidade de estocagem apresentada em cada tanque.

Além de seu papel na lise de moléculas, Chwieralski, C. E., Welte, T., & Bühling, F. (2006) consideram o envolvimento desta proteína com a apoptose, porém mesmo que a morte celular tenha ocorrido devido a indução pela Catepsina, esta indução não foi suficiente para que as taxas de apoptose levassem a algum malefício sofrido pelo organismo como a danificação de tecido. Assim como a Calreticulina, existem relato de aumento da expressão de *Catepsina B* referente a infecção do organismo por certo patógeno. Li et al. (2013) reportaram o aumento da expressão deste gene no hepatopâncreas e nas brânquias do *F. chinensis* e

sugeriram a atuação da Catpsina B em algum tipo de resposta do sistema imune, contudo a esterilidade do sistema de cultivo impediu qualquer tipo de contato dos camarões com agente infeccioso, não ocorrendo a variação dos níveis de Catepsina relacionada com tal contato. Tratando do tempo 0 pode-se atribuir a alta expressão a algum problema ocorrido durante a reação de QPCR visto que das 4 amostras de cDNA utilizadas apenas 1 apresentou amplificação das duas réplicas e essa existência de apenas um valor pode ser a causa do resultado dos cálculos da expressão relativa no tempo 0 ter sido tão mais elevado que os outros tratamentos.

Em estudo realizado por membros do mesmo grupo de pesquisa responsável por este trabalho, foram analisadas as expressões de *Calreticulina* e *Catepsina L* em camarões cultivados em alta densidade com e sem substrato. A expressão do gene *Calreticulina* foi inibida após 15 dias de tratamento, e aumentada ao final dos 30 dias de exposição nos camarões cultivados sem substrato em relação aos cultivados com substrato. Provavelmente após 30 dias estes se encontravam com um espaço menor para se locomoverem devido ao aumento da massa dos animais, portanto, apresentavam um quadro de estresse. Entretanto, a expressão relativa de *Catepsina L* se comportou de maneira inversa apresentando aumento nos 15 dias iniciais e redução ao final do experimento. Esses dados condizem com os apresentados no presente trabalho evidenciando o bom resultado da utilização de *Calreticulina* como um bom biomarcador molecular de estresse. Já para o gene da *Catepsina*, outros ensaios serão realizados ante de descartar sua utilização como biomarcador.

6 CONCLUSÃO

Ao observar os resultados de expressão para ambos os tratamentos, pode-se inferir que o gene da Calreticulina se mostrou um Biomarcador em potencial para avaliação de estresse causado por determinado substrato observando que o tratamento 2 obteve o menor nível de expressão e o melhor desempenho entre os tratamentos apresentando o maior ganho de biomassa (dado não apresentado). Por outro lado, o gene da Catepsina não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, o que indica que talvez tal gene não deva seja utilizado como biomarcador molecular, entretanto, se faz necessária outras análises da expressão deste gene neste tipo de situação para classifica-lo ou não definitivamente como um biomarcador representativo.

7 REFERÊNCIAS

- Abdussamad, E. M., e D. M. Thampy. 1994. "Cannibalism in the Tiger Shrimp *Penaeus Monodon* Fabricius in Nursery Rearing Phase". **Journal of Aquaculture in the Tropics** 9: 67–75.
- Chwieralski, C. E., T. Welte, e F. Bühling. 2006. "Cathepsin-Regulated Apoptosis". *Apoptosis* 11 (2): 143–49. <https://doi.org/10.1007/s10495-006-3486-y>.
- Delgado-Gaytán, María F., Magally L.E. Hernández-Palomares, José G. Soñanez-Organis, Adriana Muhlia-Almazán, Arturo Sánchez-Paz, Norma A. Stephens-Camacho, Elisa M. Valenzuela-Soto, e Jesús A. Rosas-Rodríguez. 2015. "Molecular Characterization and Organ-Specific Expression of the Gene That Encodes Betaine Aldehyde Dehydrogenase from the White Shrimp *Litopenaeus Vannamei* in Response to Osmotic Stress". **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology** 189 (novembro): 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.07.008>.
- "Estudo Setorial para Consolidação de uma Aquicultura Sustentável no Brasil". 2007, 313. FAO, org. 2018. Meeting the Sustainable Development Goals. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018. Rome.
- "FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2017/FAO Annuaire. Statistiques Des Pêches et de l'aquaculture 2017/FAO Anuario. Estadísticas de Pesca y Acuicultura 2017". [s.d.], 108.
- Fóes, Geraldo Kipper. 2012. "Cultivo em bioflocos (BFT) é eficaz na produção intensiva de camarões", 5.
- Gao, Weihua, Luo Tian, Tinghua Huang, Min Yao, Qiaoqing Xu, e Tai L. Guo. 2016. "Molecular Cloning and Expression of the Calreticulin Gene of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus Vannamei*, in Response to Acute Hypo-Osmotic Stress". **Aquaculture** 454 (março): 265–71. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.01.005>.
- Guo, Hui, Jian-An Xian, Bin Li, Chao-Xia Ye, An-Li Wang, Yu-Tao Miao, e Shao-An Liao. 2013. "Gene Expression of Apoptosis-Related Genes, Stress Protein and Antioxidant Enzymes in Hemocytes of White Shrimp *Litopenaeus Vannamei* under Nitrite Stress". **Comparative Biochemistry and Physiology Part C:**

- Toxicology & Pharmacology** 157 (4): 366–71.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.03.001>.
- Han, Si-yin, Meng-qiang Wang, Mei Liu, Bao-jie Wang, Ke-yong Jiang, e Lei Wang. 2018. “Comparative Sensitivity of the Hepatopancreas and Midgut in the White Shrimp *Litopenaeus Vannamei* to Oxidative Stress under Cyclic Serious/Medium Hypoxia”. **Aquaculture** 490 (março): 44–52.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.021>.
- Han, Jee Eun; Tang, Kathy F.j.; KIM, Ji Hyung. The use of beta-tubulin gene for phylogenetic analysis of the microsporidian parasite *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) and in the development of a nested PCR as its diagnostic tool. **Aquaculture**, [s.l.], v. 495, p.899-902, out. 2018. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.059>.
- Hargreaves, John A. 2013. “Biofloc Production Systems for Aquaculture”, 12.
- Hulka, Barbara S., e Timothy Wilcosky. 1988. “Biological Markers in Epidemiologic Research”. **Archives of Environmental Health: An International Journal** 43 (2): 83–89. <https://doi.org/10.1080/00039896.1988.9935831>.
- Li, Xupeng, Xianhong Meng, Jie Kong, Kun Luo, Sheng Luan, Baoxiang Cao, Ning Liu, Jinfei Pang, e Xiaoli Shi. 2013. “Molecular Cloning and Characterization of a Cathepsin B Gene from the Chinese Shrimp *Fenneropenaeus Chinensis*”. **Fish & Shellfish Immunology** 35 (5): 1604–12.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.004>.
- Lima, Juliana O., Jorge F. Pereira; Johana Rincones; Joan G. Barau; Elza F. Araújo; Gonçalo A.G. Pereira; Marisa V. Queiroz The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Genetics And Molecular Biology**, [s.l.], v. 32, n. 2, p.362-366, 2009. FapUNIFESP (SciELO).
<http://dx.doi.org/10.1590/s1415-47572009000200024>.
- Livak, Kenneth J., e Thomas D. Schmittgen. 2001. “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta CT$ Method”. **Methods** 25 (4): 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Luana, Wei, Fuhua Li, Xiaojun Zhang, Yichen Liu, e Jianhai or jian hai or jian-hai Xiang. 2007. “Molecular characteristics and expression analysis of calreticulin in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*”. **Comparative biochemistry and**

- physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology** 147 (agosto): 482–91. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.03.001>.
- Michalak, M, E F Corbett, N Mesaeli, K Nakamura, e M Opas. 1999. “Calreticulin: one protein, one gene, many functions.” **Biochemical Journal** 344 (Pt 2): 281–92.
- Moss, Komarey R. K., e Shaun M. Moss. 2004. “Effects of Artificial Substrate and Stocking Density on the Nursery Production of Pacific White Shrimp *Litopenaeus Vannamei*”. **Journal of the World Aquaculture Society** 35 (4): 536–42. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2004.tb00121.x>.
- “Pesquisa da Pecuária Municipal - PPM | IBGE”. [s.d.]. Acessado 3 de outubro de 2018. <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=downloads>.
- Sarkar, A., D. Ray, Amulya N. Shrivastava, e Subhdeep Sarker. 2006. “Molecular Biomarkers: Their Significance and Application in Marine Pollution Monitoring”. **Ecotoxicology** 15 (4): 333–40. <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0069-1>.
- Schveitzer, Rodrigo, Thais Sabino Zanetti Leite, Natacha Estér Orteney, Fabrini Copetti Temistocles Menezes, e Igor Dias Medeiros. 2018. “Format and Mode of Artificial Substrate Fixation Affect the Performance of *Litopenaeus Vannamei* in High-Density Rearing Systems”. **Aquaculture Research** 49 (3): 1357–62. <https://doi.org/10.1111/are.13561>.
- Shekhar, M.S., J. Kiruthika, e A.G. Ponniah. 2013. “Identification and Expression Analysis of Differentially Expressed Genes from Shrimp (*Penaeus Monodon*) in Response to Low Salinity Stress”. **Fish & Shellfish Immunology** 35 (6): 1957–68. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.038>.
- Stephens, A., L. Rojo, S. Araujo-Bernal, F. Garcia-Carreño, e A. Muhlia-Almazan. 2012. “Cathepsin B from the White Shrimp *Litopenaeus Vannamei*: CDNA Sequence Analysis, Tissues-Specific Expression and Biological Activity”. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology** 161 (1): 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.09.004>.
- Tacon, Albert G. J. 2002. “THEMATIC REVIEW OF FEEDS AND FEED MANAGEMENT PRACTICES IN SHRIMP AQUACULTURE”. In .
- Tacon, Albert G J, Sergio F Nates, e Roderick J McNeil. 2004. “Dietary Feeding Strategies for Marine Shrimp: A Review”, 12.

- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, e Population Division. 2019. *World Population Prospects Highlights, 2019 Revision Highlights, 2019 Revision*.
- Vega, Enrique de la, Bernard M. Degnan, Michael R. Hall, e Kate J. Wilson. 2007. "Differential Expression of Immune-Related Genes and Transposable Elements in Black Tiger Shrimp (*Penaeus Monodon*) Exposed to a Range of Environmental Stressors". **Fish & Shellfish Immunology** 23 (5): 1072–88.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.05.001>.
- Vega, Enrique de la, Michael R. Hall, Bernard M. Degnan, e Kate J. Wilson. 2006. "Short-Term Hyperthermic Treatment of *Penaeus Monodon* Increases Expression of Heat Shock Protein 70 (HSP70) and Reduces Replication of Gill Associated Virus (GAV)". **Aquaculture** 253 (1–4): 82–90.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.041>.
- Visudtiphole, Virak, Sasithorn Petkon, Kanchana Sittikankaew, Jariya Sakayaroj, e Sirawut Klinbunga. 2017. "Calcium Signaling-Related Genes in *Penaeus Monodon* Respond to Abiotic Stress and Pathogenic Bacteria Common in Aquaculture". **Aquaculture** 479 (outubro): 626–37.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.010>.
- Zhang, Xiaojun, Jianbo Yuan, Yamin Sun, Shihao Li, Yi Gao, Yang Yu, Chengzhang Liu, et al. 2019. "Penaeid Shrimp Genome Provides Insights into Benthic Adaptation and Frequent Molting". **Nature Communications** 10 (1): 1–14.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-08197-4>.
- Zhao, Qun, Luqing Pan, Qin Ren, e Dongxu Hu. 2015. "Digital Gene Expression Analysis in Hemocytes of the White Shrimp *Litopenaeus Vannamei* in Response to Low Salinity Stress". **Fish & Shellfish Immunology** 42 (2): 400–407.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.11.020>.